

発現亢進に関しては、いくつかの異なる分子制御により維持されていると考えられた。しかしながら、発熱関連分子である IL1b の持続的な遺伝子発現亢進と臨床像で見られる二峰性の発熱パターンとの不一致を説明する分子機序が不明であったため、IL1b 分子の機能を抑制する分子群をコードする遺伝子を調査した。その結果、COP, IL-1R2, sIL-1R2, MMP-1, MMP-3, および、MMP-9 などの IL1b 分子の機能を抑制する分子をコードする遺伝子の発現は、感染後 3 日目をピークとすることがわかった (Fig. 2D)。したがって、IL1b の機能抑制に関連する分子をコードする遺伝子の発現パターンは、IL1b 遺伝子の持続的な発現にも関わらず、臨床的に感染後 3 日目に解熱状態になった理由となり得ると考えられた。

D. 考察

以上の結果を総合的に判断すると、二峰性の発熱パターンの最初の波は 3 種全ての発熱関連分子 (IFNg, IL1b, and TNFa) に、2 波目は主に 1 つの発熱関連分子 (IFNg) に関係すると考えられ、それぞれの発熱が異なる機序によって制御されている可能性が示唆された。

E. 結論

この実験結果は、動物モデルで二峰性の発熱パターンを証明した最初であり、更に、二峰性発熱の分子機序を示した最初である。この病態モデルから採取したサンプルをもちいて、更に詳細な解析を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

第 58 回ウイルス学会 (徳島)

第 5 回日中インフルエンザウイルスシンポジウム (東京)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

*** Figures ***

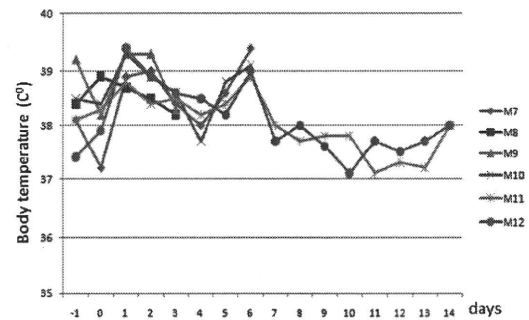


Figure 1

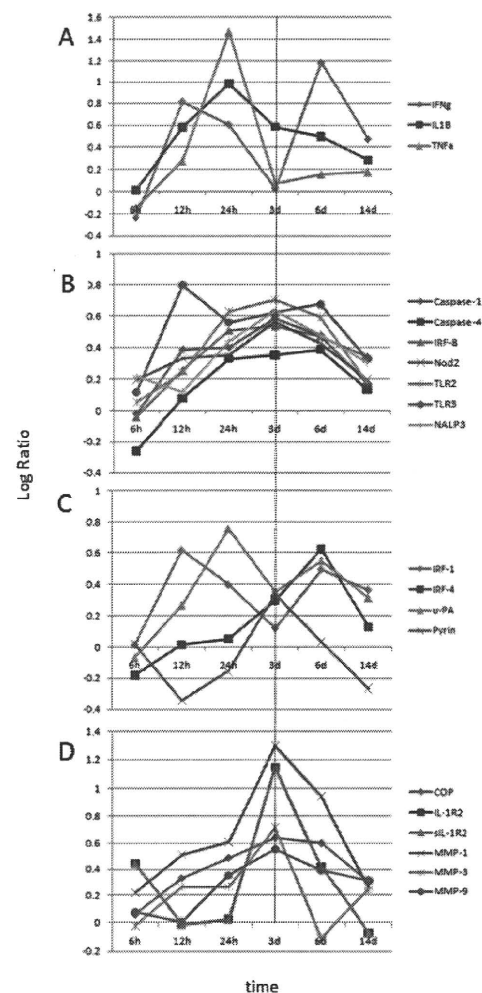


Figure 2

代謝異常における脳症の関与

インフルエンザ脳症とそれ以外の脳症の発症形態の比較およびサイトカインの脂肪酸 β 酸化能への影響評価

研究分担者 山口清次 島根大学医学部小児科・教授

研究要旨

インフルエンザ脳症の背景疾患として、発症形態に類似点のある有機酸・脂肪酸代謝異常をスクリーニングした。最近10年間のインフルエンザ脳症とその他の脳症の代謝スクリーニング依頼患者数を比較すると、インフルエンザ脳症では2004年と2009年に検査依頼数のピークがあり、4～5年の流行周期があるかもしれない。最近2年間に依頼されたインフルエンザ脳症42例とその他の急性脳症72例を比較検討したところ、年齢をみるとインフルエンザ脳症は年長児に多く、季節は冬期に多い特徴がみられた。

代謝検査の結果、確定診断された例はなかったが8例に疑わしい所見がみられた。一般生化学検査で先天代謝異常を疑わせる高アンモニア血症、低血糖などの所見が少なくとも14例（33%）にみられた。同期間に依頼されたその他の急性脳症72例では、中鎖アシル CoA 脱水素酵素 (MCAD) 欠損症1例、ミトコンドリア呼吸鎖 complex I 欠損症1例が診断された（頻度は2/72例、3%）。その他に極長鎖アシル CoA 脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症疑いの症例が1例あった。急性脳症に遭遇した時、背景疾患のみならず病態を解釈するための代謝スクリーニングを念頭において急性脳症の診療にあたるべきである。

インフルエンザ脳症の重要な病態としてサイトカインストームが注目されている。高濃度のサイトカインの β 酸化能に及ぼす影響を見るために、皮膚繊維芽細胞とタンデムマスを用いる *in vitro* probe assay を予定している。培養液中に負荷するサイトカイン (INF γ 、TNF α 、および IL-6) の安定性を評価するために、37 $^{\circ}$ Cと41 $^{\circ}$ Cで96時間まで培養した。その結果、次年度の実験系として、INF γ は1 ng/mL、TNF α は5 ng/mL、および IL6は50 ng/mLの濃度で行えることを確認した。また培養液中のカルニチン濃度も変えて、カルニチンの影響も検討したい。

研究協力者

山田健治、Purevusren J、虫本雄一

市山高志

小林弘典、長谷川有紀

(山口大学医学部小児科学)

(以上 島根大学医学部小児科学)

A. 研究目的

インフルエンザ脳症は、それまで元気だった小児がインフルエンザ感染による高熱とともに電撃的に発症する。一方、先天代謝異常である有機酸・脂肪酸代謝異常症の一部に、これに類似した発症形態をとる疾患がある。そこで両者の関連性が注目されている。臨床的に鑑別しなければならない疾患である。

2009年から新型インフルエンザが問題になり、脳症患者の発症時期や年齢に変化が見られた可能性がある。我々は、小児の急性脳症を中心に、患者の血液、尿を質量分析によって代謝スクリーニングを行っている。そこでインフルエンザ脳症と先天代謝異常の関連性を調べるために、代謝スクリーニング依頼を受けたインフルエンザ脳症とそれ以外の急性脳症患者の発症年齢、季節、および代謝プロフィールを比較検討した。

またインフルエンザ脳症の原因は未だに不明であるものの、病態として中枢神経におけるサイトカインストームが考えられている。そこで、サイトカインストームが急性の脂肪酸代謝障害を起こして急性脳症に発展するという仮説を立てて、培養細胞を用いる実験系を作るため、基礎実験を行った。今年度具体的には、培養液中でのサイトカインの安定性を検討した。

B. 研究方法

1. インフルエンザ脳症とその他の脳症の発症形態の比較：

2001年～2010年の期間に島根大学に代謝スクリーニングを依頼された症例のうち、インフルエンザ脳症とそれ以外の脳症の依頼件数の動向を調べた。

2. 2009年1月から2010年12月の代謝スクリーニング依頼患者の動向と結果の検討

新型インフルエンザが社会問題化した2009年と昨年2010年の2年間に、代謝スクリーニング依頼のあったインフルエンザ脳症42例と、それ以外の急性脳症72例の患者を対象に、年齢分布、季節的変動、および代謝スクリーニングの結果を調査した。

3. サイトカインのβ酸化能への影響評価のための基礎実験：

β酸化能を評価する方法として皮膚繊維芽細胞とタンデムマスを用いる *in vitro* probe assay がある。この方法は、培養液に基質を加えて72～96時間培養して培養液中に分泌されたアシルカルニチンをタンデムマス法で測定することによって、β酸化能をみる方法である。INF γ (1～10pg/mL)、TNF α (1～10ng/mL)、およびIL6 (1～10ng/mL)を96時間まで安定性を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究は、臨床現場から診断のために血液や尿の分析を依頼された症例数の調査であり、患者さんの個人情報に含まれていない。また、遺伝子検査を実施する研究ではなく、遺伝学的検査関連のガイドラインには該当しない。

C. 研究結果と考察

1. インフルエンザ脳症とその他の脳症の発症形態の比較

(a) 年度別検査依頼患者数の変動

2001年～2010年の期間に代謝スクリーニングを依頼されたインフルエンザ脳症とそれ以外の脳症の依頼件数は、図1に示すように、インフルエンザ脳症に関しては年度ごとに症例数に変動が大きかった。最近10年間では、2004年と2009年をピークに周期がみられた。4～5年の周期があるかもしれない。その他の急性脳症の代謝スクリーニング依頼検体数の年度別変動は比較的少ない。2004年のみ少ないのは、この年

に島根大学の検査体制を変えた影響があると思われる。

(b) 季節的変動

2010年のインフルエンザ脳症とその他の脳症の代謝スクリーニング依頼頻度は、図2に示すように、1月のみ多く、以後は減少し、秋の10月からやや増加している。全体的に2010年はインフルエンザ脳症の依頼が非常に少なかったが、この要因として2009年の夏から秋に新型インフルエンザが大流行して、2010年に入ってからインフルエンザが収束した影響が考えられる。

2. 最近2年間(2009年1月から2010年)の代謝スクリーニング結果

(a) インフルエンザのウィルスの型と脳症の転帰

2009年1月～2010年12月の期間中に依頼された46例のインフルエンザ関連脳症の患者内訳は以下の通りであった。インフルエンザウィルスの型は、A型33名(うち新型9名)、B型4名、および不明9名であった。臨床診断名として、インフルエンザ脳症20名、インフルエンザ脳症疑い(意識障害の遷延など)16名、インフルエンザ関連死(SIDSも含む)5名、異常行動等神経症状5名であった。死亡例は46例中7名であった。

(b) 年齢別内訳の比較

最近2年間のインフルエンザ脳症とその他の脳症患者の検査依頼数を比較すると、図3に示すように、インフルエンザ脳症は1～3才と6～12才(学童)の患者が比較的多いのにに対し、インフルエンザ以外の脳症では、3才以降には著しく少ない傾向がみられた。インフルエンザ脳症は比較的年長児に多いのがその他の脳症と異なる点といえる。

(c) 代謝スクリーニングの結果(表1)

明らかな先天代謝異常が同定された症例はなかったが、先天代謝異常症の疑い症例

は8例あった。内訳は、カルニチン欠乏疑い5例、 β ケトチオラーゼ欠損症の疑い、グルタル酸血症2型疑い、およびメチルマロン酸血症疑いが、各1例ずつあった。

先天代謝異常を疑わせる臨床所見を示した症例は、高アンモニア血症11例、肝機能異常(AST/ALT高値)14例、血中CK高値9例などがあった(オーバーラップ有り)。これに対し、その他の急性脳症72例では、中鎖アシルCoA脱水素酵素(MCAD)欠損症1例、ミトコンドリア呼吸鎖complex1欠損症が1例あった(頻度は2/72例、3%)。その他に極長鎖アシルCoA脱水素酵素(VLCAD)欠損症疑いの症例が1例あった。

タンデムマスによる血中アシルカルニチン分析、GC/MSによる尿中有機酸分析を行っているが、両方を同時にスクリーニングできなかった症例も少なくない。重症度や検体採取のタイミングによって検査結果が影響を受けると思われるので、急性脳症に遭遇した時、背景疾患のみならず病態を解釈するための代謝スクリーニングを念頭において急性脳症の診療にあたるべきである。

3. サイトカインの β 酸化能への影響評価のための基礎実験

皮膚繊維芽細胞とタンデムマスを用いて β 酸化能を評価するin vitro probe assayがある。(Li H, Yamaguchi S, et al., Brain & Development, 2010)。この方法を用いて、培養液中にサイトカインを添加する実験の前段階として、培養液中のサイトカインの安定性を調べた。その結果、図4、5、6に示すように、 $\text{INF}\gamma$ は少なくとも1 ng/mLで96時間までは検出でき、 $\text{TNF}\alpha$ は少なくとも10 pg/mL、およびIL6は少なくとも1 ng/mLで安定であることを確認した。この実験は37°Cのみならず、41°Cでも行い同様の結果を確認している。

インフルエンザ脳症のサイトカインシステムにおけるサイトカイン濃度は、 $\text{INF}\gamma$ は

〜0.1 ng/mL、TNF α は〜1 ng/mL、および IL6 は〜10 ng/mL まで上昇する可能性がある。前段階実験で、TNF α は 5 ng/mL の濃度で細胞のダメージが強かった。そこで、次年度のサイトカインの β 酸化への影響を評価する実験系として、INF γ 1 ng/mL、TNF α は 5 ng/mL、および IL6 は 50 ng/mL の濃度で β 酸化能を評価する予定である。また現在の系では過剰量（正常の約 10 倍）のカルニチン存在下で行っているが、カルニチン濃度を生理的な濃度に下げた状態でも検討したい。

D. 結論

有機酸・脂肪酸代謝異常のスクリーニングを行ったインフルエンザ脳症患者の動向について調査し、その他の急性脳症と比較した。インフルエンザ脳症は 4〜5 年周期で流行するかもしれないことがわかった。また最近 2 年間に限っては確定診断された先天代謝異常はみられなかったが、臨床所見、代謝スクリーニング結果からみて疑わしい患者はおおよそ数%にみられた。インフルエンザ脳症のサイトカインストームが脂肪酸 β 酸化を抑制するという仮説を立てて、今年度先行実験を行い培養液中でのサイトカインの安定性を検討し、次年度の実験系を立てた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakagawa K, Kawana S, Hasegawa Y, Yamaguchi T: Simplified method for the chemical diagnosis of organic aciduria using GC/MS. *Journal of Chromatography B* 878(13-14): 942-948, 2010 (April)
- 2) Tsuburaya R, Sakamoto O, Arai N, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Shigematsu Y, Takayanagi M, Ohura T,

Tsuchiya S: Molecular analysis of a presymptomatic case of carnitine palmitoyl transferase I (CPT I) deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening in Japan. *Brain & Development* 32: 409-411, 2010 (May)

- 3) Li H, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Mushimoto Y, Yamaguchi S: Effect of heat stress and bezafibrate on mitochondrial β -oxidation: Comparison between cultured cells from normal and mitochondrial fatty acid oxidation disorder children using in vitro probe acylcarnitine profiling assay. *Brain & Development* 32: 362-370, 2010 (May)
- 4) Endo M, Hasegawa Y, Fukuda S, Kobayashi H, Yotsumoto Y, Mushimoto Y, Li H, Purevsuren J, Yamaguchi S.: In vitro probe acylcarnitine profiling assay using cultured fibroblasts and electrospray ionization tandem mass spectrometry predicts severity of patients with glutaric aciduria type2. *Journal of Chromatography B* 878: 1673-1676, 2010 (Jun)
- 5) Hori T, Fukao T, Kobayashi H, Teramoto T, Takayanagi M, Hasegawa Y, Yasuno T, Yamaguchi S, Kondo N: Carnitine palmitoyltransferase 2 deficiency: the time-course of blood and urinary acylcarnitine levels during initial L-carnitine supplementation. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 221(3): 191-195, 2010 (Jun)
- 6) Li H, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Mushimoto Y, Yamaguchi S: Heat Stress Deteriorates

- Mitochondrial β -Oxidation of Long-chain Fatty Acids in Cultured Fibroblasts with Fatty Acid β -Oxidation Disorders. *Journal of Chromatography B* 878(20): 1669-1672, 2010 (Jun)
- 7) Kawana S, Nakagawa K, Hasegawa Y, Yamaguchi S: Simple and rapid analytical method for detection of amino acids in blood using blood spot on filter paper, fast-GC/MS and isotope dilution technique. *Journal of Chromatography B* 878: 3113-3118, 2010 (November)
- 8) 長谷川有紀, 山口清次: 新生児突然死の原因と予防. *産婦人科治療* 100(増刊): 793-796, 2010年(4月)
- 9) 栗野宏之, 八木麻理子, 起塚庸, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次, 坂本修, 大浦敏博, 竹島泰弘, 松尾雅文: 幼児期に繰り返す嘔吐発作で発症したメチルマロン酸血症の同胞例. *日本小児科学会雑誌* 114(6): 961-965, 2010年(6月)
- 10) 小林弘典, 山口清次: 新しい新生児マススクリーニング: タンデムマスの導入. *Neonatal Care* 23(9): 889-894, 2010年(9月)
- 1st Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases. Fukuoka, March 2010
- 3) Purevsuren J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Mushimoto Y, Fukuda S, Yamaguchi S: Toxic effect of cereulide of bacillus cereus on mitochondrial fatty acid oxidation. 第52回日本先天代謝異常学会. 大阪, October 2010
- 4) Yamaguchi S: Pediatric emergency and nutritionally treatable inborn errors of metabolism. 7th Asia-pacific regional meeting of the international society for neonatal screening, Lecture. Indonesia, October 2010
- 5) 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, 李紅, プレブスレンジャミヤン, 山口清次: 末梢リンパ球とタンデム質量分析を用いた簡便な脂肪酸代謝異常症の酵素活性評価. 第113回日本小児科学会. 岩手, 2010年4月
- 6) 塩田光隆, 齊藤景子, 西田仁, 熊倉啓, 水本洋, 吉岡孝和, 羽田敦子, 虫本雄一, 山口清次, 奏大資: 死亡例も認めたセレウス菌による嘔吐型食中毒の3症例. 第113回日本小児科学会. 岩手, 2010年4月
- 7) 山口清次: 小児突然死を引き起こすような代謝異常とタンデムマスによる予防. 第2回こども急性疾患学寄附講座「こどもの救急医療のこれから」講演. 神戸, 2010年6月
- 8) 長谷川有紀, 虫本雄一, 小林弘典, プレブスレン ジャミヤン, 山口清次: 乳幼児期に嘔吐発作で発症した有機酸・脂肪酸代謝異常症患者の検討. 第52回日本先天代謝異常学会. 大阪, 2010年10月
- 9) 小林弘典, プレブスレン ジャミヤン, 李紅, 虫本雄一, 長谷川有紀, 山口清

2. 学会発表

- 1) Yamaguchi S: Heat Stress and Acute Encephalopathy in Childhood due to Inherited Organic and Fatty Acid Disorders. *International Symposium on Epilepsy in Neurometabolic Diseases*. Taipei, Taiwan, 2010
- 2) Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Li H, Mushimoto Y, Yamaguchi S: Developed diagnostic method for carnitine cycle disorders using in vitro acylcarnitine probe assay. The

次：ミトコンドリア三頭酵素欠損症に対するベサフィブレードの効果に関する In vitro probe assay での検討. 第52回日本先天代謝異常学会. 大阪, 2010年10月

mitochondrial fatty acid oxidation disturbance. 第42回日本小児感染症学会. 仙台, 2010年11月

10) Purevsuren J, 長谷川有紀, 山口清次:
Acute encephalopathy due to emetic toxin bacillus cereus and

F. 知的所有権の取得状況

特許取得、実用新案登録：該当なし

表1. インフルエンザ脳症関連疾患46例の代謝解析結果(2009-10)

インフルエンザのウィルス型	A型：33例 B型：4例 不明：9例
インフルエンザ脳症関連疾患の内訳	①インフルエンザ脳症：20例 ②インフルエンザ脳症疑い：16例 ③インフルエンザ関連死：5名 ④異常行動・神経症状：5名
代謝スクリーニング結果	① 確定診断例なし ② カルニチン欠乏疑い：5名 ③ β ケトチオラーゼ欠損症の疑い：1例 ④ グルタル酸血症2型疑い：1例 ⑤ メチルマロン酸血症疑い：1例
先天代謝異常を疑わせる臨床所見	① 高アンモニア血症：11例 ② 肝機能異常 (AST/ALT 高値)：14例 ③ 血中CK高値：9例

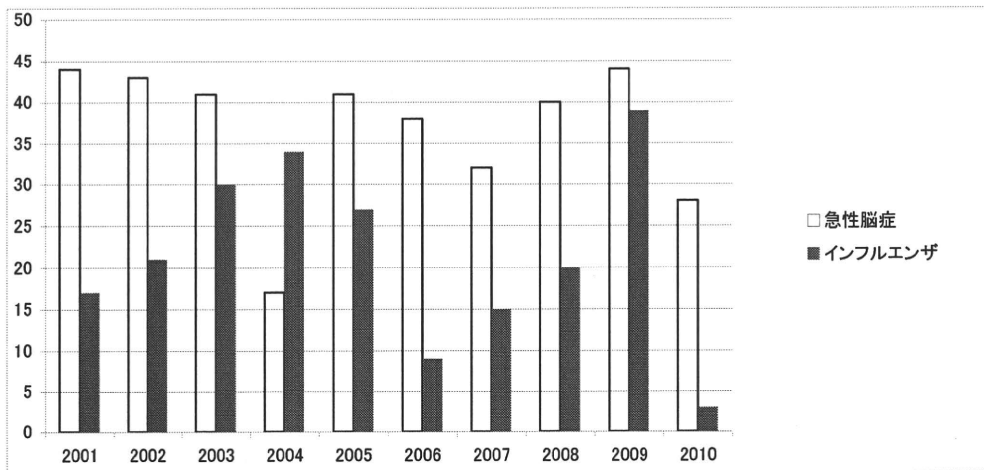


図1. 急性脳症とインフルエンザ脳症の代謝スクリーニング依頼件数の年別推移

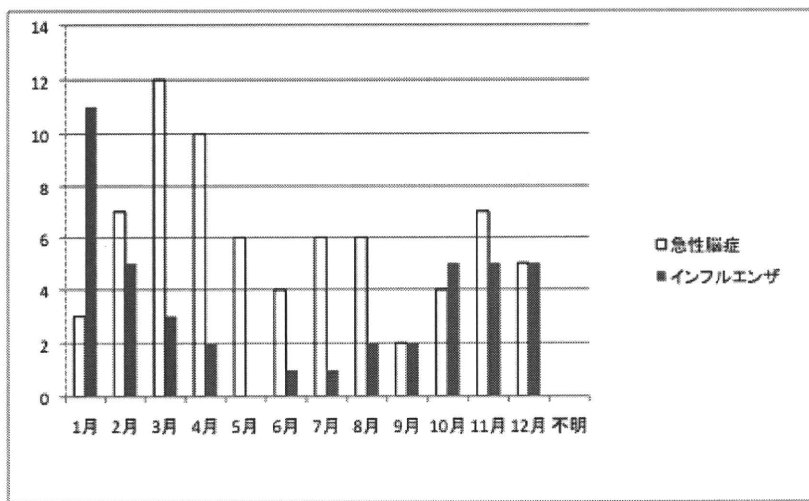


図2. 2010年の急性脳症とインフルエンザ脳症の代謝スクリーニング依頼件数の月別変化

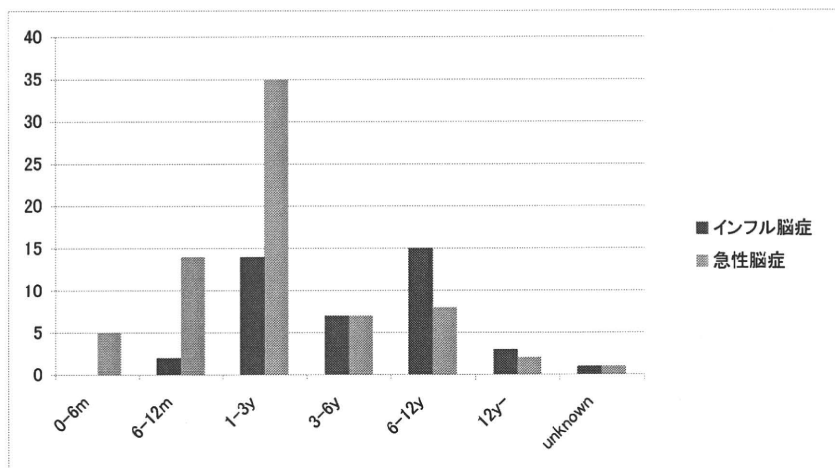


図3. 急性脳症とインフルエンザ脳症の代謝スクリーニング依頼患者の年齢別比較

図4. INF γ の培養液中の安定性

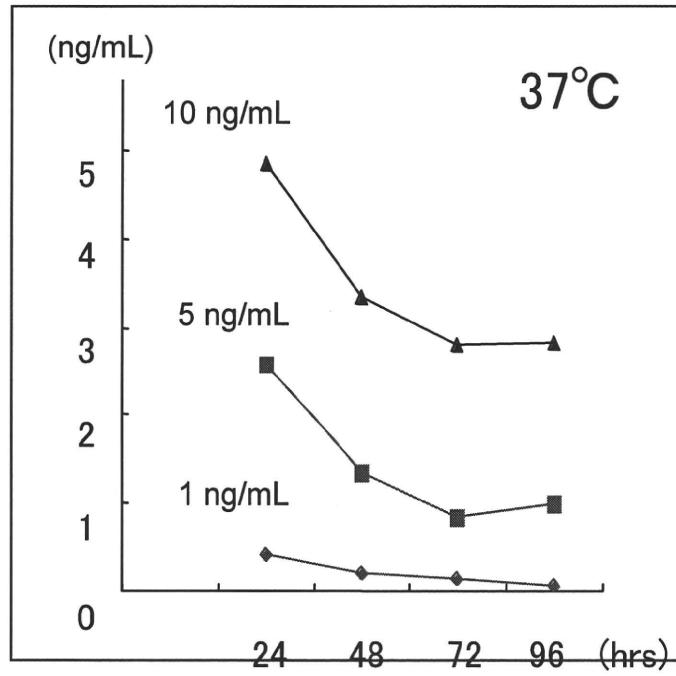


図5. TNF α の安定性

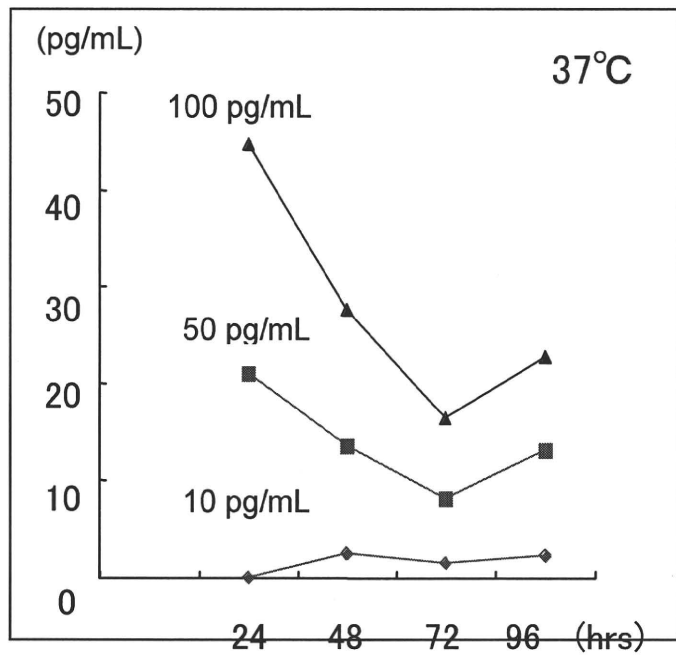
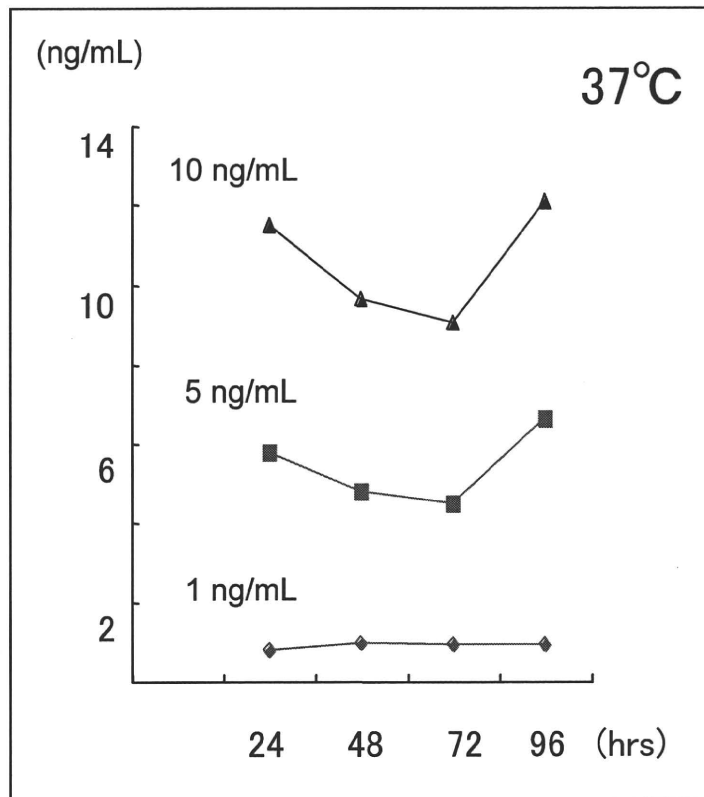


図6. IL-6の安定性



急性脳症関連遺伝子の解析

研究分担者 水口 雅（東京大学大学院医学系研究科 発達医科学 教授）

研究要旨

急性脳症の発症に関与する遺伝的素因を解明する目的で、ミトコンドリア酵素 carnitine palmitoyltransferase II (CPTII) をコードする遺伝子の熱感受性多型について検討した。CPTII 遺伝子エクソン4の遺伝型を解析したところ、熱感受性多型を示す特定のアレルを1つ以上有する率が、急性脳症の症例群では対照群に比し有意に高かった。CPTII の熱感受性多型はインフルエンザ脳症を含む急性脳症発症のリスクファクターであることが示された。

A. 研究目的

インフルエンザ脳症に代表される急性脳症は、東アジア（日本、台湾、韓国）で多発しており、人種別の報告数の差は大きい。いっぽう先行するウイルス感染症（インフルエンザ、突発性発疹など）はありふれたもので、人種別の罹病率の差は大きくない。したがって急性脳症の発症には遺伝的要因が関与し、これが人種と相関している可能性が強く推測される。

われわれは近年、急性脳症の遺伝的素因の解明を目的とし、急性脳症の症例を対象に候補遺伝子の変異・多型を調べてきた。本年度は主に、ミトコンドリア酵素 carnitine palmitoyltransferase II (CPTII) の多型について解析を行った。

CPT-II の熱感受性多型がインフルエンザ脳症重症例のリスクファクターであることは、2005年、Chenらにより初めて指摘された。CPTII はミトコンドリア内膜に局在し、細胞質から運ばれて来たア

シルカルニチンをミトコンドリア内でアシル CoA とカルニチンとに分解する酵素であり、ミトコンドリア機能に果たす役割は大きい。ChenらはCPTII 遺伝子エクソン4内の3多型（1055T>G/F352C、1102G>A/V368I、1939A>G/M647V）がCPTIIの41℃における酵素活性の著しい低下（熱感受性）を招くこと、またインフルエンザ脳症患者群においてこれら多型の特定の組み合わせを有するアレル頻度が対照群より有意に高いことを指摘した。

私たちは「CPTII 多型がインフルエンザ脳症のみならず、他のウイルス感染による急性脳症においてもリスクファクターである」という仮説をたて、これを検証する目的で、本研究を遂行した。

B. 研究方法

日本人の急性脳症 58 症例からインフォームド Consentのもと末梢血を採取し、ゲノム DNA を抽出した。症例の年齢は8月から8歳までで、うち80%の症例

は2歳未満であった。対照となる日本人成人200人のDNAを、市販のB細胞ライン (Pharma SNP Consortium) から抽出した。

AmpliAq PCR キット (Applied Biosystems) を用いたPCR法によりCPTII 遺伝子エクソン4を増幅した。PCR産物とクローン化したCPTII 遺伝子をABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (ABI) を用いて直接シーケンシングした。ハプロタイプ解析では、CPTII 遺伝子エクソン4のヘテロ遺伝型 (1055T>G/F352Cと1102G>A/V368I) をpCR2.1ベクターにクローニングした。統計学的解析にはFisherの正確確率検定を用いた。

本研究の実施に先立ち、東京大学ゲノム倫理審査委員会による審査を受け、承認を受けた。

C. 研究結果

F352C アレル頻度は急性脳症群で42/58 = 72.4%、対照群で173/200 = 86.5%であり、前者で有意に高かった ($P = 0.015$)。3箇所の多型 (F352C、V368I、M647V) の組み合わせによる9型の遺伝型の個々については両群間に有意差がなかった。しかしCIMアレルを少なくともひとつ有する遺伝型の頻度は急性脳症群で14/29、対照群で26/100であり、前者で有意に高かった ($P = 0.038$)。なおCIMのホモ接合体が急性脳症群に3例あったが、いずれも予後良好だった。うち1例は経過中に横紋筋融解症を併発するなど、CPTII欠損症に似た症状を呈した。

D. 考察

本研究の結果により、日本人の急性脳症の発症に対して「CPTII 遺伝子のF352Cアレルを少なくともひとつ有すること」が

リスクファクターであることが判明した。F352CはCaucasianにはなく、東アジア人のみで報告された多型である。このことは、急性脳症が東アジア人に多い理由の1つと考えられる。CPTIIを高発現した細胞系において、CIM-CPTIIの酵素活性は野生型 (FVM-CPTII) に比し正常体温 (37°C) でも低く、高体温 (41°C) ではさらに低下することが示されている (Chen et al, 2005)。「CPTIIの熱感受性のため、高体温でミトコンドリア機能が急激に低下して、energy crisis をきたすことにより急性脳症が発症する」という仮説はきわめて魅力的であり、今後もさらに追試、検討する必要がある。

E. 結論

日本人小児における急性脳症の発症に関し、CPTIIの熱感受性多型はリスクファクターのひとつであることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

ア. 原著論文

- (1) Trinh QD, Pham NT, Nguyen TA, Phan TG, Yan H, Hoang le P, Khamrin P, Maneekarn N, Li Y, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Sequence analysis of the VP7 gene of human rotaviruses G2 and G4 isolated in Japan, China, Thailand, and Vietnam during 2001–2003. *J Med Virol.* 2010; 82(5): 878–885.
- (2) Dey SK, Phathamavong O, Okitsu S, Mizuguchi M, Ohta Y, Ushijima H. Seasonal pattern and genotype distribution of norovirus infection in Japan. *Pediatr Infect Dis J.* 2010; 29(5): e32–34.
- (3) Hayakawa Y, Zhou Y, Mizuguchi M, Frey

- TK, Ushijima H. Quantitative and qualitative assay of rubella IgA antibody in breast milk. *J Med Virol* 2010; 82(8): 1475-1479.
- (4) Tumurkhuu M, Saitoh M, Sato A, Takahashi K, Mimaki M, Takita J, Takeshita K, Hama T, Oka A, Mizuguchi M. Comprehensive genetic analysis of overlapping syndromes of RAS/RAF/MEK/ERK pathway. *Pediatr Int* 2010; 52(4): 557-562.
- (5) Thongprachum A, Chaimongkol N, Khamrin P, Pantip C, Mizuguchi M, Ushijima H, Maneekarn N. A Novel Multiplex RT-PCR for identification of VP6 subgroups of human and porcine rotaviruses. *J Virol Methods* 2010; 168(1/2): 191-196.
- (6) Chan-it W, Thongprachum A, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Epidemiological and molecular characterization of sapovirus and astrovirus in Japan. *Jpn J Infect Dis* in press.
- (7) Pham NT, Trinh QD, Chan-It W, Khamrin P, Shimizu H, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. A novel RT-multiplex PCR for detection of Aichi virus, human parechovirus, enteroviruses, and human bocavirus among infants and children with acute gastroenteritis. *J Virol Methods* in press
- (8) Kohno S, Kida H, Mizuguchi M, Shimada J; for the S-021812 Clinical Study Group. Efficacy and safety of intravenous peramivir for the treatment of seasonal influenza. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(11): 4568-4574.
- (9) Takahashi K, Oka A, Mizuguchi M, Saitoh M, Takita J, Sato A, Mimaki M, Kato M, Ogawa S, Igarashi T. Interstitial deletion of 13q14.13-q32.3 presenting with Arima syndrome and bilateral retinoblastoma. *Brain Dev* in press.
- (10) Mizuno Y, Takahashi K, Igarashi T, Saito M, Mizuguchi M. Congenital infection-like syndrome with intracranial calcification. *Brain Dev* in press.
- (11) Shinohara M, Saitoh M, Takanashi JI, Yamanouchi H, Kubota M, Goto T, Kikuchi M, Shiihara T, Yamanaka G, Mizuguchi M. Carnitine palmitoyl transferase II polymorphism is associated with multiple syndromes of acute encephalopathy with various infectious diseases. *Brain Dev* in press.
- (12) Thongprachum A, Khamrin P, Chaimongkol N, Malasao R, Okitsu S, Mizuguchi M, Maneekarn N, Ushijima H. Evaluation of an immunochromatography method for rapid detection of noroviruses in clinical specimens in Thailand. *J Med Virol* 2010; 82(12): 2106-2109.

イ. 総説

- (1) 水口雅. インフルエンザ脳症の診療ガイドライン改訂を踏まえて. *日本医事新報* 2010; 4480: 73-77.
- (2) 水口雅. 小児の急性脳症 (Reye 症候群を含む) 金澤一郎、永井良三 (編) 今日の日診断指針第6版、医学書院、東京、2010, pp. 1844-1846.
- (3) 水口雅. 急性脳症. 五十嵐隆 (編) 総合小児科診療のための小児科学レビュー 2010、総合医学社、東京、2010, pp. 85-91.

- (4) 水口雅. インフルエンザ脳症の診断と治療. 小児内科 2010; 42(9): 1505-1508.
- (5) 水口雅. 急性脳症の治療. 日本小児科学会雑誌 2010; 114(9): 1381-1388.
- (6) 水口雅. 新型インフルエンザ脳症への対応. 日本医師会雑誌 2010; 139(10): 1487-1490.
- (7) 水口雅. 脳症の診断・治療. 菅谷憲夫 (編) インフルエンザ診療ガイド 2010-11、日本医事出版社、東京、2010、pp. 52-57.
- (8) 水口雅. インフルエンザ脳症ガイドライン改訂版にもとづく治療. 日本薬剤師会雑誌 2010; 62(11): 1433-1437.
- (7) 毛利万里子, 内野俊平, 高橋寛, 水野葉子, 岩崎博之, 水口雅, 五十嵐隆: 周期性一側性てんかん型放電(PLEDs)が検出された細菌性髄膜炎の1例. 第574回日本小児科学会東京都地方会講話会, 東京, 2010年5月8日
- (8) 齋藤真木子, 高梨潤一, 山内秀雄, 久保田雅也, 後藤知英, 菊地正広, 椎原隆, 山中岳, 水口雅: 日本人急性脳症患者の遺伝的素因について- SNPによるCPT1I遺伝子型解析-. 第52回日本小児神経学会総会 福岡, 2010年5月20日
- (9) 内野俊平, 水野葉子, 岩崎博之, 高橋寛, 齋藤真木子, 水口雅: 痙攣重積型急性脳症の臨床経過. 第52回日本小児神経学会総会 福岡, 2010年5月20日

2. 学会発表

- (1) 水口雅: [急性脳症の診療・研究最前線] インフルエンザ脳症の最新情報. 第52回日本小児神経学会総会シンポジウム, 福岡, 2010年5月22日
- (2) 水口雅: [ペラミビル]成人における安全性. 第58回日本化学療法学会総会学術集会新薬シンポジウム, 長崎, 2010年6月3日
- (3) 水口雅: 急性脳症の病因・病態・治療. 第209回日本小児科学会宮城地方会, 仙台, 2010年6月26日
- (4) 水口雅: 急性脳症の治療. 第113回日本小児科学会学術集会、盛岡、2010年4月25日
- (5) 水口雅: 小児神経学会が支援する共同研究. 急性脳症の分子遺伝学的病態解析. 第52回日本小児神経学会総会教育セミナー 福岡, 2010年5月22日
- (6) 齋藤真木子, 篠原麻由, 高橋寛, 山中岳, 雨宮馨, 久保田雅也, 水口雅: テオフィリン関連急性脳症におけるアデノシン受容体A2aのSNP解析. 第113回日本小児科学会学術集会、盛岡、2010年4月25日
- (10) 山口結, 石垣景子, 皆川公夫, 久保田雅也, 玉井浩, 平林伸一, 愛波秀男, 市山高志, 夏目淳, 浜野晋一郎, 水口雅, 岡明, 前垣義弘, 吉川秀人, 原寿郎: 我が国における小児急性散在性脳脊髄炎, 多発性硬化症の全国疫学調査- 1次調査結果-. 第52回日本小児神経学会総会 福岡, 2010年5月20日
- (11) 鳥巢裕幸, 石垣景子, 皆川公夫, 久保田雅也, 玉井浩, 平林伸一, 愛波秀男, 市山高志, 夏目淳, 浜野晋一郎, 水口雅, 岡明, 前垣義弘, 吉川秀人, 原寿郎: 我が国における小児急性散在性脳脊髄炎, 多発性硬化症の全国疫学調査- 臨床的特徴について-. 第52回日本小児神経学会総会 福岡, 2010年5月20日

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
なし。

インフルエンザ脳症の遺伝子多型解析

分担研究者 筈田泰誠

所属・役職 理化学研究所ゲノム医科学研究センター・チームリーダー

研究要旨

インフルエンザ脳症の発症に関連する遺伝子を、全ゲノム領域を対象とした一塩基多型 (SNP) 解析にて同定し、インフルエンザ脳症の発症リスクを事前に予測するツールを開発することを目的としている。本年度は、既に実施した、日本人小児インフルエンザ脳症患者 72 名を対象とした約 55 万 SNP による genome-wide association study で同定された関連候補 SNP について、追加サンプルのジェノタイピングを実施した。

A. 研究目的

日本においてインフルエンザの学童罹患数は、年間 50 万から 100 万人である。そのうち 100 から 300 人がインフルエンザ脳症を合併する。インフルエンザ脳症の死亡率は 30%前後と高く、生存例においても重篤な後遺症を残す症例が多いため社会的関心が高まっている。

インフルエンザ脳症の詳細な発症機序は不明であるが、日本人での報告が多いことから遺伝的背景が関与していると考えられる。本研究では、インフルエンザ脳症発症に関与する遺伝的背景を解明するため、一塩基多型 (SNP) を用いて、全ゲノム領域を対象とした関連解析を行った (genome-wide association study: GWAS)。本研究により、インフルエンザ脳症の遺伝的背景を解明することができれば、ハイリスク群を事前に特定でき、積極的にワクチン接種を行うという予防が可能となる。また、感受性遺伝子の特定は、インフルエンザ脳症の新たな治療法の開発にもつながる

と考えられる。

B. 研究方法

研究期間および規模

5 年間とし、200 名から検体を採取し解析を行う。

研究対象

インフルエンザ脳症を発症した 1 歳以上の小児および脳症を発症しなかった 1 歳以上のインフルエンザ患者とする。

SNP 解析

国際 HapMap データベースの情報に基づいて抽出した約 55 万 SNP について、患者 DNA サンプルをジェノタイピングし、インフルエンザ脳症-コントロール関連解析を行う。

(倫理面への配慮)

I. 研究等の対象とする個人の権利擁護

本研究に同意するか否かは本人 (対象が 16 歳未満の場合は、本人および代諾者) の全くの自由意志に委ねられ、同意しない場

合であってもいかなる不利益も被ることはないことを保証する。本研究は連結可能匿名化を行う。個人識別情報は、担当者が厳重に保管・管理し、外部へは決して提供しない。また、同意はいつでも撤回できることを保証する。同意が撤回された場合は、すみやかに検体をオートクレーブにかけ廃棄する。

II. 研究への参加者に理解を求め同意を得る方法

検体の提供を受ける際には、説明文書を用いて提供者（16歳未満の場合は、提供者および代諾者）との質疑応答を経て、本研究についてじゅうぶんに理解されたことを確認した後に同意を得る。これらの説明文書では、本研究の意義、目的、遺伝子解析などについて解説し、プライバシーの保護の方法、提供者の権利、研究に協力することの利益と不利益、本研究終了後の検体の取り扱い方針について説明する。同意をいただいた方には、同意書に自署をお願いする。同意書は、鍵のかかるロッカーにて厳重に保管・管理する。

III. 研究によって生じる個人への不利益ならびに危険性と科学的な貢献の予測

本研究成果により、インフルエンザ脳症の感受性遺伝子が同定されれば、ハイリスク群をスクリーニングすることが可能となる。インフルエンザの感染予防に対してはワクチンの接種という非常に有効な予防法が存在するため、ハイリスク群に対しては積極的にワクチン接種をすすめることにより、インフルエンザ脳症の罹患を予防することが可能となる。

また、感受性遺伝子の同定は、その遺伝子またはカスケードをターゲットとした新たな治療法の確立にも貢献すると確信する。

個人情報の漏洩により人権の侵害を被る

可能性があるが、本研究では、担当者が個人情報厳重に保管・管理し、個人情報・プライバシーの保護には万全をつくす。

インフルエンザ脳症は、ほとんどが10歳までの発症であり、遺伝的背景を研究することは、患者の健康に対して利益はあるものの、その後の社会的な不利益や危険性があるとは常識的に考えられない。

IV. 遺伝カウンセリング体制の整備

個人情報の管理に記したように、本研究の結果を提供者が知ることにより提供者や血縁者の生命の危機を回避できる可能性がある。この場合には、遺伝子情報を提供者や家族に報告する可能性がある。そのような遺伝情報を知るとは、生命危機を回避することを目的にしているため、患者および家族の利益となるが、そのことを正確に理解し、受け入れることを支援するために日本遺伝カウンセリング学会認定医が遺伝カウンセリングを行う体制を整備している。

V. 研究終了後の検体の取り扱い

提供者の承諾が得られた場合に限り将来の本研究以外のインフルエンザ脳症に関連した医学研究に用いることがある。ただし、その場合は連結不可能匿名化を行う。研究終了後の保管に関しては、説明文書を用いて提供者（16歳未満の場合は、提供者および代諾者）に十分説明する。

研究終了後の検体の保管を承諾されなかった場合には、すみやかに検体をオートクレーブにかけ破棄する。

C. 研究結果

本年度は、既に実施した GWAS（日本人小児インフルエンザ脳症患者72名（ケース群）及び日本人一般集団934名（コントロール群））による関連解析におけるP値の小さい上位78 SNP ($P < 1.0 \times 10^{-4}$) の検証を

行った (replication study)。日本人小児インフルエンザ脳症患者 13名の DNA サンプルをジェノタイピングし、GWAS サンプル及び追加サンプルを合わせて解析した結果、P 値が genome-wide significance を満たす SNP は見られなかった。

インフルエンザ脳症との関連が報告されている carnitine palmitoyltransferase II (CPT2) の SNP (F352C、V368I、M647V) について関連解析を実施したが、有意な関連は見られなかった。

インフルエンザ脳症患者 85 例について、HLA-A、B、C 及び DRB1 アレルとの関連を調べたが、有意な関連は見られなかった。

D. 考察

本研究では、症例数が少ない場合でも、遺伝子型の疾患発症に対する寄与が大きければ疾患関連遺伝子を同定することができるものと考え、高速・大量 SNP ジェノタイピングによる GWAS を選択したが、P 値が genome-wide significance を満たす SNP は同定されていない。今後、新たな患者 DNA サンプルを対象に replication study を継続するとともに、DNA マイクロアレイによる発現解析で同定された遺伝子を対象とした関連解析を実施する予定である。

E. 結論

日本人小児インフルエンザ脳症患者を対象とした GWAS において、P 値が genome-wide significance を満たす SNP は見られなかった。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

III 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
水口雅	小児の急性脳症 (Reye 症候群を含む)	金澤一郎、永井良三	今日の診断指針第 6 版	医学書院	東京	2010	1844-1846
水口雅	急性脳症	五十嵐隆	総合小児科診療のための小児科学レビュー-2010	総合医学社	東京	2010	85-91
水口雅	脳症の診断・治療	菅谷憲夫	インフルエンザ診療ガイド 2010-11	日本医事出版社	東京	2010	52-57
水口 雅、市山高志、塩見正司	急性脳症・脳炎	大場洋	小児神経の画像診断	秀潤社	東京	2010	350-361
市山高志	亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) 症状・徴候と検査	厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班」	プリオン病と遅発性ウイルス感染症	金原出版	東京	2010	278-282

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tsuge M, Yasui K, Ichiyawa T, Saito Y, Nagaoka Y, Yashiro M, Yamashita N, Morishima T.	Increase of tumor necrosis factor-alpha in the blood induces early activation of matrix metalloproteinase-9 in the brain.	Microbiol Immunol.	54(7)	417-424	2010
Kawabe S, Ito Y, Ohta R, Sofue A, Gotoh K, Morishima T, Kimura H.	Comparison of the levels of human herpesvirus 6 (HHV-6) DNA and cytokines in the cerebrospinal fluid and serum of children with HHV-6 encephalopathy.	J Med Virol	82(8)	1410-1415	2010
Yasui K, Yashiro M, Tsuge M, Manki A, Takemoto K, Yamamoto M, Morishima T.	Thalidomide dramatically improves the symptoms of early-onset sarcoidosis/Blau syndrome: its possible action and mechanism.	Arthritis Rheum	62(1)	250-257	2010
Sakabe S, Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Nidom CA, Le MQ, Takano R, Kubota-Koketsu R, Okuno Y, Ozawa M, Kawaoka Y.	A cross-reactive neutralizing monoclonal antibody protects mice from H5N1 and pandemic (H1N1)2009 virus infection.	Antiviral Research	88	249-255	2010
Nakagawa K, Kawana S, Hasegawa Y, Yamaguchi S	Simplified method for the chemical diagnosis of organic aciduria using GC/MS.	Journal of Chromatography B	878	942-948	2010
Tsuburaya R, Sakamoto O, Arai N, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Shigematsu Y, Takayanagi M, Ohura T, Tsuchiya S.	Molecular analysis of a presymptomatic case of carnitine palmitoyl transferase I (CPT I) deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening in Japan.	Brain & Development	32	409-411	2010